Über die

Oxydationen in lebenden Zellen nach Versuchen am Seeigelei.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

hohen medizinischen Fakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität zu Heidelberg

vorgelegt von

Otto Warburg.

Heidelberg.
Buch- und Kunstdruckerei Rößler & Herbert.
1911.

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität Heidelberg.

Dekan:
Prof. Nissl.

Referent:
Prof. Gottlieb.

1911.

Die Versuche über die Oxydationen im Ei[1]) habe ich fortgesetzt und verfüge jetzt über viele hundert Messungen. Von diesen will ich einige, die mir wichtig erscheinen, mitteilen.

Als Material wurde meist Strongylocentrotus lividus gewählt, dessen Eier widerstandsfähiger sind und sich infolgedessen besser für Experimente eignen. Die Sauerstoffbestimmungen wurden nach Winkler oder Schützenberger ausgeführt und im übrigen so, wie ich es in der ersten Arbeit beschrieben habe. Ein Th. hinter den Zahlen bedeutet, wenn nichts dazu bemerkt ist, abgelesene Kubikzentimeter Thiosulfat (1 ccm = ca. 0,06 ccm Sauerstoff), ein H. abgelesene Kubikzentimeter Hydrosulfit (1 ccm = ca. 0,1 ccm Sauerstoff). Zum Vergleich wurden diesmal meist keine Stickstoffbestimmungen gemacht, sondern ein und dasselbe Material in gleiche Teile geteilt; dies ist genauer. Für jeden neuen Versuch findet sich ein Protokoll im Anhang. Die eingeklammerten Nummern entsprechen den Protokollnummern im Anhang.

I.

Wenn man das Ei des Seeigels befruchtet, so steigt in kurzer Zeit der Sauerstoffverbrauch, z. B. auf das Sechsfache. Ein derartiges Resultat besagt zunächst weiter nichts, als dass eine ruhende Zelle einen niedrigeren Stoffwechsel hat als eine, die sich entwickelt, und wird in dieser Form fast selbstverständlich erscheinen. Über die Verkettung der Prozesse: Zellteilung, Kernteilung, Steigerung der Oxydationen wissen

1) Warburg, Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. LVII, S. 1; Bd. LX, S. 443.

wir eins, durch Loeb:[1]) Kern- und Zellteilung hören auf, wenn man den Eiern den Sauerstoff entzieht. Die Oxydationen sind also eine notwendige Bedingung für Kern- und Zellteilung. Ich habe mich gefragt, ob auch die Kern- und Zellteilung ihrerseits eine notwendige Bedingung für die Oxydationen sind, mit anderen Worten, ob die erwähnten Vorgänge unter allen Umständen miteinander verkettet sind. Das ist durchaus nicht der Fall. Fügt man zu Seewasser sehr wenig Phenylurethan, so wird Zell- und Kernteilung unterdrückt, der Sauerstoffverbrauch dagegen sinkt nur sehr wenig.

Beispiele:

Atmung in Seewasser	in Phenylurethan-Seewasser ca. $^1/_{2000}$-normal
[1] a) 7,5	7,3 Th.
b) 6,2	5,0 „
c) 6,9	6,5 „

Die grösste Differenz, die ich überhaupt erhielt, ist in Versuch b) mitgeteilt und beträgt ca. 20%, während der Unterschied zwischen befruchteten und unbefruchteten Eiern ca. 600% ist.

Es war nun wichtig, zu wissen, welche morphologischen Prozesse in dem Phenylurethan-Seewasser noch vor sich gehen. Ich habe deshalb befruchtete Eier in kurzen Intervallen konserviert, die, bei 15°, teils in Seewasser, teils in Phenylurethan-Seewasser atmeten. Verteilt wurde das Material 30 Minuten nach der Befruchtung, als die Kerne deutlich, noch nicht aufgelöst, in der Mitte waren. Die Schnitte wurden mit Hämalaun gefärbt[2]).

Es kommt also in dem Phenylurethan-Seewasser zur Anlage der Astrosphären, die aber sehr klein sind und sich nicht vom Kern entfernen, selbst in einer Zeit (130 Minuten),

---

1) Pflügers Archiv, Bd. LXII (1895). Zitiert, wie auch im folgenden nach: J. Loeb, Die chemische Entwicklungserregung des tierischen Eies.)

2) Die Bilder sollen gelegentlich publiziert werden.

	In Seewasser	In Phenylurethan-Seewasser ca. $^1/_{2000}$-normal
Nach 25 Minuten	beginnende Kernauflösung, Astrosphären	Kerne nicht aufgelöst, keine Astrosphären
Nach 40 Minuten	Hantelstadium, beginnende 2-Teilung	Kerne aufgelöst, Astrosphären ganz eng um den Kern
Nach 90 Minuten	Auflösung der Kerne und Astrosphärenbildung in den 2er Blastomeren	Äquatorialplatte
Nach 130 Minuten	beginnende 4-Teilung	die Astrosphären sind nicht auseinandergegangen

nach der die Kontrolle schon in das Vierzellenstadium überzugehen beginnt; oder: ein Stadium, das in Seewasser in 35 Minuten erreicht wird, wird bei gleichem Alter des Ausgangsmaterials auch in 130 Minuten nicht erreicht. Hieraus folgt, dass auch Kernauflösung und Astrosphärenbildung nicht die Ursache der Steigerung der Oxydationsprozesse sein können.

Zusammenfassend können wir sagen: die sichtbaren Veränderungen im sich entwickelnden Ei sind keine Bedingung für die Änderung der Oxydationen nach der Befruchtung. Da anderseits nach der Loebschen Entdeckung die Oxydationsprozesse eine Bedingung für die sichtbaren Veränderungen sind, so sind diejenigen chemischen Prozesse, als deren Mass man den Sauerstoffverbrauch betrachten darf, den morphologischen Prozessen übergeordnet. Diese Tatsache wird für jede künftige Fragestellung über die Ursachen des Zellwachstums von Bedeutung sein.

Man wird bemerken, dass die angeführten Zahlen auch von Wichtigkeit sind für die Theorie der Narkose (das Phenylurethan gehört in die Klasse der indifferenten Narkotica[1])) und dass sie weder die Hypothese von Hans Meyer[2]), noch

1) Overton, Studien über die Narkose, Jena, 1901.

2) Nach Meyer (Münchener med. Wochenschrift, Bd. LVI, S. 1577) steigt der Stoffwechsel, weil vorher getrennte Substanzen zusammenkommen. Seine Gründe, soweit sie lebende Zellen betreffen, sind die

die von Verworn stützten. Für Verworn[1]) könnte ich anführen, dass grössere Konzentrationen von Phenylurethan die Atmung allerdings erheblich vermindern, z. B.

Atmung in See-wasser	in Phenylurethan-Seewasser ca. $^1/_{500}$-normal
[2] 6,5	3,7 Th.
5,6	2,5 „

Es handelt sich aber nicht um die Frage, ob man mit einem Narkoticum die Oxydationen überhaupt herunterdrücken kann, sondern, wie sich die Oxydationen bei der eben wirksamen Grenzkonzentration des Narkoticums verhalten.

II.

Die künstliche Beeinflussung der Oxydationsprozesse hat nur dann Bedeutung für das Verständnis der physiologischen Verbrennung, wenn man eine Beeinflussung auf dem Umweg über Wachstum, Entwicklung oder andere physiologische Funktionen[2]) ausschliessen kann. Bei Säugetieren, Amphibien usw. ist das geradezu unmöglich, und deshalb haben uns die Respirationsversuche, die an solchen Objekten vorgenommen wurden, in der Theorie der Oxydationen nicht weiter gebracht. Selbst bei einem so einfachen Material wie den Hefezellen konnte ich eindeutige Resultate nicht erhalten, und man wird gewiss nicht sagen können, dass Pepton die Atmung steigert, wenn eine mit Pepton ernährte Hefe mehr Sauerstoff verbraucht als eine hungernde.

Entwicklungserregung des tierischen Eis und schlafender Pflanzentriebe durch Narkotica. Es handelt sich aber, wie aus VI dieser Arbeit hervorgeht, um eine indirekte Wirkung auf den Stoffwechsel.

1) Verworn, Deutsche med. Wochenschrift, 1909, Nr. 37. Nach Verworn sind während der Narkose „die Oxydationsprozesse in der lebendigen Substanz gelähmt."

Aus meinen Zahlen dagegen folgt, dass die Furchung des narkotisierten Eis weder unterbleibt, weil der Stoffwechsel gestiegen, noch weil er gesunken ist. Anders ausgedrückt: in der Narkose führen die Oxydationen nicht zu dem normalen physiologischen Erfolg.

2) Ein Spezialfall dieser Forderung ist es, dass die Beeinflussung bis zu einem gewissen Grad reversibel sein muss.

Vor einiger Zeit teilte ich mit[1]), dass das befruchtete oder unbefruchtete Ei des Seeigels in einer hypertonischen Lösung, in der die Entwicklungsprozesse sistiert sind, viel mehr Sauerstoff verbraucht als in Seewasser. Hier handelt es sich um eine direkte Beeinflussung der Oxydationsprozesse; doch hat die Versuchanordnung den Nachteil, dass man die Eier in einer bestimmten hypertonischen Lösung eine ganz bestimmte Zeit lassen muss, wenn man Furchungen erhalten will, und dass sie andernfalls beim Zurückbringen in Seewasser bald zerfallen. Die hypertonische Lösung gibt also, in Neapel wenigstens, keine reinen Resultate. Die Zahlen über die Atmung der Strongylocentrotus-Eier sind nur mitgeteilt, weil die Verhältnisse etwas anders liegen, als bei Arbacia, die mir zu meinen früheren Versuchen diente.

Dagegen fand ich, dass sich die Oxydationen im Ei (Strongylocentrotus lividus) durch Änderung der Wasserstoffionenkonzentration des Seewassers sehr erheblich beeinflussen lassen, und hier liegen die Verhältnisse so einfach, dass eine ausführliche Beschreibung der Versuche angezeigt ist.

Herbst[2]) und Loeb[3]) haben fast gleichzeitig die Entdeckung gemacht, dass für die Entwicklung des Eis eine bestimmte Konzentration der OH-Ionen eine notwendige Bedingung ist. Loeb knüpfte daran die Vermutung, dass in alkalischer Lösung die Oxydationen begünstigt würden; später[4]) konnte er seine Hypothese experimentell stützen, als sich zeigte, dass für die Entwicklungserregung des Eis durch Alkalien Sauerstoff nötig ist. —

Wenn man zu Seewasser Salzsäure gibt, so steigt, wegen des Gehalts an Bicarbonat, die Wasserstoffionenkonzentration sehr langsam, während die Spannung der Kohlensäure schnell wächst. Da nun die Kohlensäure, abgesehen von den Wasserstoffionen, die sie abspaltet, physiologische Wirkungen, z. B. als Narkoticum, ausübt, so eignet sich angesäuertes Seewasser

1) Zeitschrift f. physiolog. Chemie loc. cit.
2) Archiv f. Entwicklungsmechanik, Bd. II, S. 486, u. Bd. XVVII, S. 385.
3) Ebenda, Bd. VII, S. 631, und Pflügers Archiv, Bd. CIII.
4) Loeb, Entwicklungserregung, S. 123.

nicht für Versuche über den Einfluss der Wasserstoffionen. Alle Versuche, bei denen weniger als 3 ccm $^{n}/_{10}$-HCl zu 100 ccm Neapeler Seewasser zugegeben wurden, sind nicht Salzsäure-, sondern Kohlensäurewirkungen; also Mischwirkungen von CO_2-Molekülen und Wasserstoffionen. Macht man Seewasser mit Laugen alkalisch, so wächst die Hydroxylionenkonzentration sehr langsam, wieder wegen des Gehalts an Bicarbonat. Aus diesen Gründen benutzte ich künstliche Lösungen; eine Mischung von 100 Molekülen NaCl. 22 Molekülen KCl und 20 Molekülen $CaCl_2$,[1]) alle $^{6}/_{10}$ normal, wird im folgenden als „Salzlösung" bezeichnet. In einer derartigen Flüssigkeit entwickeln sich die befruchteten Eier von Strongylocentrotus zu schwimmenden Larven, wenn ihr eine passende Menge Hydroxylionen zugesetzt sind[2]).

1. In einer Salzlösung, die auf 1000 ccm 10 ccm $^{n}/_{10}$-NaOH enthält, steigt der Sauerstoffverbrauch des befruchteten Eis sehr stark an, während Zell- und Kernteilung sistiert sind.

Zum Beispiel:

1000 Salzlösung + 10 NaOH (keine Entwicklung)	Kontrollsalzlösung vom OH-Ionengehalt des Seewassers[2]) (normale Entwicklung)
12,7	7,6 Th.
11,9	5,7 „
[3] 12,8	6,8 „

In einem Fall fand ich eine Steigerung von nur 40 % und die Entwicklung war nicht vollständig sistiert, sondern nur verlangsamt.

2. In einer Salzlösung, der weder Bikarbonat noch NaOH zugefügt ist, ist der Sauerstoffverbrauch sehr stark herabgedrückt, Zell- und Kernteilung sind sistiert.

Zum Beispiel:

	Salzlösung	Seewasser
Befruchtete Eier	0,8 H	2,4 H [4]
Larven	3,0 „	9,8 „

1) Eine derartige Lösung ist von Loeb vielfach benutzt worden.
2) Auf 1000 Salzlösung 5 $^{m}/_{2}$-Bicarbonat und 2 $^{n}/_{10}$-NaOH.

Eine Salzlösung, die nicht unter besonderen Vorsichtsmassregeln hergestellt wird, enthält immer Spuren von CO_2; der Kohlensäuredruck in der Zelle muss unter solchen Bedingungen in der Zelle unuormal gross werden und es fragte sich, ob hierdurch die Wirkung der künstlichen Flüssigkeit auf die Atmung zustande kommt. Einer kohlensäurefreien[1]) Salzlösung werden H-Ionen in Form von NaH_2PO_4 zugefügt.

Auf 1000 Salzlösung 0,5 ccm n-NaH_2PO_4	Seewasser
[5] 1,1 H.	5,7 H.

Die Atmung ist also noch tiefer gesunken, als in dem Versuch mit CO_2-haltiger Salzlösung. Die Atmungskohlensäure kommt, da die Eier kaum atmen, nicht in Betracht.

Um aber ganz sicher zu gehen, habe ich noch 2 Lösungen verglichen, die bei gleicher Wasserstoffionenkonzentration ganz verschiedene Mengen CO_2 enthielten, und erhielt keinen Unterschied im Sauerstoffverbrauch.

1000 Seewasser + 10 ccm $^n/_{10}$-HCl	Salzlösung
Tension der Kohlensäure	Tension der Kohlensäure
ca. 16 mm	ca. 0,15 mm
[6] 5,5	5,8

Hiermit ist sichergestellt, dass die künstliche Salzlösung vermöge ihres Wasserstoffionengehalts die Oxydationen herabdrückt, während die Konzentration der CO_2-Moleküle in den untersuchten Grenzen die Atmung nicht beeinflusst.

Ich verteilte nun gleiche Teile einer Eiportion in folgende 3 Flüssigkeiten:

I. Salzlösung Reaktion gegen Rosolsäure[2]) bräunlich.

II. 1000 Salzlösung + 5 $^m/_2$-Bicarbonat + 2 $^n/_{10}$-NaOH-Reaktion gegen Neutralrot gelb; Phenolphthalein schwach rosa.

III. 1000 Salzlösung + 10 ccm $^n/_{10}$-NaOH.

Wenn auch die Indikatoren für die Salzlösung noch nicht mit der Gaskette geeicht sind, so lässt sich die Wasserstoffionenkonzentration dieser 3 Lösungen mit Hilfe der

---

1) Das zur Herstellung benutzte destillierte Wasser wird in Jenaer Gefässen ausgekocht.

2) Auf 10 ccm Lösung 0,05 ccm einer 0,3 %igen Indikatorlösung.

Friedentalschen Tabelle[1]) annähernd folgendermassen angeben:

I. 10^{-6}.

II. 10^{-8}.

III. 10^{-11}.

Sauerstoffverbrauch bei H-Ionenkonzentration:

[7] $\begin{cases} 10^{-6} : 1{,}4 \text{ H. keine Furchung,} \\ 10^{-8} : 3{,}9 \text{ H. normale Furchung,} \\ 10^{-11} : 8{,}1 \text{ H. keine Furchung.} \end{cases}$

Der Sauerstoffverbrauch wächst also sehr langsam mit abnehmender Wasserstoffionenkonzentration der Salzlösung; in dem angeführten Beispiel ist er nicht umgekehrt proportional den Konzentrationen der Wasserstoffionen, sondern eher mit ihren Logarithmen.

Ein Ei, dessen Atmung auf $^1/_3$ gesunken ist, furcht sich nicht 3mal so langsam, sondern gar nicht; ein Ei, dessen Atmung auf das Doppelte gestiegen ist, furcht sich nicht doppelt so schnell, sondern gar nicht. Hieraus ergibt sich, dass die Beeinflussung der Oxydationen durch Wasserstoffionen nicht indirekt durch Beeinflussung der Entwicklung erfolgt. Nach den Atmungsversuchen in Seewasser zurückgebracht, furchten sich die Eier weiter; die in der alkalischen Salzlösung gewesen waren, erreichten nicht das Larvenstadium, dagegen stets diejenigen, die in der sauren Salzlösung geatmet hatten.

III.

Wie kommt nun die Beeinflussung der Oxydationen durch Wasserstoffionen zustande?

Die einfachste und nächstliegende Erklärung ist die, dass in alkalischer Lösung die tierischen Verbrennungen, wie so viele chemische Reaktionen, beschleunigt werden. Vorausgesetzt wird dabei, dass die Ionen in die Zellen eindringen. Grade diese Voraussetzung war mir, nach dem Studium der Arbeiten Overtons[2]), unwahrscheinlich. Ich will nun zeigen, dass die OH-Ionen nicht in das Ei eindringen.

1) Arbeiten aus dem Gebiet der experimentellen Physiologie, S. 336.

2) Besonders Pflügers Archiv, Bd XCII, S. 115, 346 (1902) und Bd. CV, S. 176 (1904).

Loeb[1]) hat gefunden, dass die lebenden und sich furchenden Eier des Seeigels mit Neutralrot sich rot färben, und konnte mit Hilfe dieses Farbstoffs demonstrieren, dass das befruchtete Ei mehr Säure bildet als das unbefruchtete. Ich benutzte zur Entscheidung meiner Frage den gleichen Farbstoff. Befruchtete Eier von Strongylocentrotus wurden mit Neutralrot gefärbt und dann in die alkalische Salzlösung ($H : 10^{-11}$) gebracht, die die Oxydationen so erheblich steigert. In dieser Lösung blieben sie stundenlang[2]) rot, genau so wie in Seewasser. Hiermit ist jedoch nichts entschieden, da man nicht weiss, ob das Neutralrot als Indikator in der Zelle anwendbar ist.

Ich habe mir deshalb eine Flüssigkeit hergestellt, deren Hydroxylionen von einer in die Zelle eindringenden Base geliefert wurden. In 50 ccm Seewasser wurden 2 ccm $^{n}/_{10}$-NH_3 gegeben; die OH-Ionenkonzentration ist dann viel kleiner als die der alkalischen Salzlösung. Trotzdem schlagen in einer solchen Lösung die mit Neutralrot rotgefärbten Eier, innerhalb einer Minute etwa, in Gelb um. Wäscht man hierauf mit ammoniakfreiem Seewasser, so stellt sich die rote Färbung ebenso schnell wieder her und die rotgefärbten Eier furchen sich ungeschädigt weiter. Das Neutralrot zeigt also auch in der lebenden Zelle eine Änderung des Hydroxylionengehalts an.

Gegen diese Feststellung kann der Einwand gemacht werden, dass in der alkalischen Salzlösung doch OH-Ionen eindringen und dass schon sehr wenig genügen, um die Atmung zu steigern; mit andern Worten, dass die Atmung ein empfindlicherer Indikator auf OH-Ionen ist als Neutralrot. Ich habe deshalb die Atmung des befruchteten Eies in Ammoniakseewasser untersucht, in der das mit Neutralrot gefärbte Ei gelb ist.

Beispiel:

Seewasser	Ammoniakseewasser
[8] 10,1	11,0 Th.

Wie man sieht, atmet das gegen Neutralrot alkalische Ei nur 10% mehr als das gegen Neutralrot saure Ei. Diese

1) Biochem. Zeitschrift, Bd. II, S. 34 (1906).

2) Solange ich sie überhaupt beobachtete.

Eier sind nicht geschädigt, sondern in Seewasser zurückgebracht, entwickeln sie sich zu schwimmenden Larven (während der Exposition in dem Ammoniakseewasser findet keine Furchung statt).

Die geringe Steigerung, die für die zu entscheidende Frage gar nicht in Betracht kommt, ist auf die Änderung der OH-Ionenkonzentration ausserhalb des Eis zurückzuführen.

Es gibt jetzt noch zwei Möglichkeiten: entweder reagieren die OH-Ionen mit der Plasmahaut und die Oxydationen ändern sich, weil sich die Plasmahaut ändert; oder sie üben ihre Wirkung aus nur durch ihre Anwesenheit in der die Zelle umspülenden Lösung. Die Entscheidung wird getroffen durch zwei Tatsachen, die Jaques Loeb[1]) gefunden hat:

1. Die Hydroxylionen wirken nur bei Anwesenheit von Sauerstoff auf das Ei.

2. Die Membranbildung, d. h. die Veränderung des Eies, die eine Änderung der Oxydationen zur Folge hat, geht auch ohne Sauerstoff (man hätte sonst daran denken können, dass die direkte Reaktion der OH-Ionen mit der Plasmahaut nur unter Sauerstoffaufnahme erfolgt).

Resultat:

Die Beeinflussung der Atmung durch Vermehrung der OH-Ionenkonzentration oder, was dasselbe sagt, durch Verminderung der H-Ionenkonzentration kommt weder dadurch zustande, dass die Ionen eindringen, noch dadurch, dass sie mit der Plasmahaut reagieren, sondern einfach durch ihre Anwesenheit in der die Zelle umspülenden Lösung. Die Plasmahaut ist der einzige Teil der Zelle, der mit dem äusseren Milieu in Berührung ist, und deshalb muss ihr physikalischer oder chemischer Zustand von grösster Bedeutung für die physiologische Verbrennung sein.

Wir nähern uns hier der Loebschen[2]) Theorie, nach der die Membranbildung ein entscheidender Vorgang für die Entwicklungserregung ist. Loeb hatte beobachtet, dass immer dann der Anstoss zur Entwicklung gegeben ist, wenn das Ei

1) Loeb, Entwicklungserregung, z. B. S. 123.
2) „ „ Einleitung, Seite XVI.

auf irgend eine Weise zur Membranbildung gebracht wurde. Wie aber die oberflächliche Cytolyse solche Wirkungen hervorbringt, blieb eine offene Frage. Ich glaube, dass wir in den mitgeteilten Versuchen ihre Beantwortung sehen dürfen[1]).

Loeb hat an eine Änderung der Durchlässigkeit für Sauerstoff gedacht. Es ist im allgemeinen seit Pflüger und Pfeffer bekannt, dass in den Zellen stets überschüssiger Sauerstoff ist, und man müsste schon für das Ei eine Ausnahmestellung nach dieser Richtung annehmen. Nun habe ich aber nachgewiesen[2]), dass die Oxydationsgeschwindigkeit im Ei unabhängig vom Sauerstoffdruck, d. h. unabhängig von der Sauerstoffkonzentration im Ei ist, während diese Geschwindigkeit durch Veränderung anderer Bedingungen sehr erheblich beeinflusst werden kann. Daraus ergibt sich, dass Durchlässigkeitsänderungen für Sauerstoff nicht in Betracht kommen können für die Oxydationsgrösse. (Selbstverständlich muss nach dem Massenwirkungsgesetz die Reaktionsgeschwindigkeit des Sauerstoffs sich ändern, wenn seine Konzentration sich ändert. Da sich nun die Oxydationsgrösse nicht ändert, so heisst das, dass die Übertragung des Sauerstoffs sehr schnell erfolgt, im Vergleich zur Bildung der Sauerstoffaffinitäten. Diese Überlegungen sind in ähnlicher Form schon im Jahre 1889 von Pfeffer[3]) sehr klar ausgesprochen worden. Für die experimentelle Begründung jedoch liegen die Verhältnisse beim Seeigelei sehr günstig, weil wir hier eine direkte Steigerung der Oxydationen durch andere Mittel sehr leicht erreichen).

Hier ist auch der Ort, auf eine Hypothese von Lillie[4]) einzugehen. Nach diesem Forscher hat die Plasmahaut Be-

1) Sichtbare Membran und Plasmahaut sind ja nicht zu verwechseln. Die Beziehungen lassen sich so ausdrücken, dass Membranbildung ohne Veränderung der Plasmahaut nicht vorkommt, dagegen häufig das Umgekehrte.

2) Zeitschrift f. physiolog. Chemie, Bd. 57, 4. Herr Dr. M. Henze hat kürzlich diese Verhältnisse in etwas anderer Weise und genauer untersucht und ist, wie er mir mitzuteilen erlaubt, zu demselben Ergebnis gelangt.

3) Abhandlungen der mathematisch-physikalischen Klasse der Königl. Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften, Bd. XV, Nr. 5.

4) Lillie (R.), Amer. Journ. of Physiology, Bd. XXIV, S. 14 und Bd. XXVI, S. 106.

deutung für die Oxydationsprozesse, weil ihre Durchlässigkeit für Kohlensäure unter verschiedenen äusseren Bedingungen verschieden ist; die Kohlensäure soll in der Zelle in einem Gleichgewicht mit oxydablen Stoffen stehen; wenn mehr fortgeschafft wird, soll mehr verbrannt werden. Es ist nun erstens, besonders durch Overton, bekannt, dass die Plasmahaut für Kohlensäure ebenso durchlässig ist, wie für die andern lipoidlöslichen Stoffe; zweitens fällt im speziellen die Lilliesche Hypothese durch den Versuch über die Unabhängigkeit der Oxydationsgrösse von der Tension der Kohlensäure, den ich oben mitgeteilt habe.

IV.

Nach diesem Resultat kam ich auf die Vermutung, dass Wirkung der Salze auf das Ei in gleicher Weise zustande kommen könne, indirekt, durch Beeinflussung der Oxydationen.

Ich ging aus von den Versuchen J. Loebs über die Giftigkeit einer reinen Kochsalzlösung[1]). Wenn man nämlich Seetiere in eine reine NaCl-Lösung von der Konzentration des Seewassers bringt, so sterben sie bald, fügt man aber Ca-Ionen oder selbst Zn- oder Pb-Ionen in bestimmten Mengen hinzu, so wird die Giftigkeit der NaCl-Lösung aufgehoben. Erklärungsmöglichkeiten für diese merkwürdigen Erscheinungen sind von Loeb mehrere gegeben worden, ohne dass er sich für eine bestimmte entschieden hätte. Das Gemeinsame ist die Voraussetzung, dass das Chlornatrium in die Zelle hineindiffundiert.

Höber[2]), der sich viel mit der Theorie ähnlicher Tatsachen beschäftigt hat, ist der Meinung, dass die Salze auf die Plasmahaut wirken „durch Auflockerung oder Verdichtung der Hautkolloide." Seine Argumente sind teils die Resultate Overtons, teils eigene Untersuchungen über Ähnlichkeit der Ionenwirkungen auf Kolloide und lebende Zellen.

Overton[3]) hat am Froschmuskel Beobachtungen über die Wirkung isoosmotischer Salz- (und Non-Elektrolyt)lösungen

1) Pflügers Archiv, Bd. LXXXVIII, S. 68.

2) Hofmeisters Beiträge, Bd. V, S. 432 (u. Gordon) u. Bd. XI, S. 35. Zeitschrift f. allg. Physiol., Bd. X, S. 173.

3) Pflügers Archiv, Bd. XCII, S. 346.

gemacht, die nicht weniger überraschend waren, als die Loebschen Ergebnisse an Fundulus; er neigt zu der Ansicht, dass durch die Plasmahaut ein Kationenaustausch stattfindet. —

Wenn man die Eier von Strongylocentrotus lividus etwa eine Stunde nach der Befruchtung in eine reine, dem Seewasser isotonische NaCl-Lösung bringt, so beginnt ein Teil schon nach ca. 10 Minuten die Symptome der schwarzen Cytolyse zu zeigen; nach 20 bis 30 Minuten sind die meisten Eier cytolysiert und natürlich nicht mehr imstande, sich in Seewasser zu entwickeln. Ich habe nun gefunden, dass die Giftigkeit einer NaCl-Lösung durch eine Spur Natriumcyanid aufgehoben werden kann (Konzentration des Cyanids: $^1/_{10000}$-n. [9a], das heisst: wenn man die Sauerstoffatmung herunterdrückt, so wirkt eine NaCl-Lösung nicht giftig. Dies kann zwei Ursachen haben: entweder eine atmende Zelle wird durch die unbekannte schädigende Wirkung des Chlornatriums stärker affiziert als eine Zelle, deren Stoffwechsel gehemmt ist, oder die NaCl-Lösung wirkt auf die Oxydationen und mit Hilfe der Oxydationen giftig. Von diesen beiden Möglichkeiten kann ich, auf Grund von Messungen, die zweite als die richtige bezeichnen. In einer reinen NaCl-Lösung sind die Oxydationen des befruchteten Eies so stark gesteigert, dass diese Steigerung allein die Giftwirkung völlig hinreichend erklärt.

Ich habe oben mitgeteilt, dass die befruchteten Eier in einer reinen NaCl-Lösung schnell zerstört werden, und man wird fragen, wie eine exakte Messung unter solchen Umständen möglich ist. Man muss hier einen kleinen Kunstgriff benutzen, nämlich die Atmung in einer cyanidhaltigen NaCl-Lösung messen und vergleichen mit einer cyanidhaltigen Lösung, die ausser NaCl noch andere Ionen in passender Menge, z. B. $CaCl_2$ und KCl. enthält. Man findet dann das Verhältnis 5 : 1. Die NaCl-Lösung wirkt also nicht giftig, weil in ihr NaCl in das Ei hineindiffundiert oder weil andere Salze aus dem Ei austreten, sondern weil die Oxydationen auf das 5fache gesteigert werden.

Beispiele:

(Die Flüssigkeiten waren beide $^1/_{10000}$-n bezügl. NaCN.)

NaCl-Lösung	„Salzlösung“
3,8	0,7 Thiosulfat,
[9] 3,9	0,8 Hydrosulfit.

Ebenso wie nach Loeb die Giftwirkung durch Zusatz zweiwertiger Ionen beseitigt wird, finden wir die normale[1]) Oxydationsgrösse, wenn wir zu der NaCl-Lösung eine geeignete Menge $CaCl_2$ zufügen.

Atmung in NaCl, KCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $MgSo_4$: 7,8 Th.
„ „ NaCl, KCl, $CaCl_2$: 7,5 „
„ „ NaCl, $CaCl_2$: 8,2 „ } [10]

In Lösung I und II ging die Entwicklung zu Larven (beobachtet bis zur Abwerfung der Dotterhaut) so gut wie in Seewasser; in III furchten sich die Eier lange Zeit wie normal, erreichten aber nicht das Larvenstadium.

V.

Von dem gleichen Gesichtspunkt aus betrachte ich die Resultate, die ich mit kleinen Mengen Kupfer-, Silber- und Goldionen erhielt. In Seewasser, das bezüglich dieser Metalle $^1/_{100000}$-normal war, blieb die Furchung befruchteter Eier von Strongylocentrotus stehen oder war sehr verlangsamt, während der Sauerstoffverbrauch stets grösser war, als in der Kontrolle normal sich furchender Eier.

	Konzentration:	Kontrolle in Seewasser:	Steigerung in % der Atmung in Seewasser:
Au	10^{-5}: 6,5	5,1	27
Au	10^{-5}: 6,0	4,0	50
Ag	10^{-5}: 3,7	3,1	20
Cu	10^{-5}: 5,4	4,4	23
[11]	$Cu^1/_3$ 10^{-4}: 12,0	7,8	54
	$Cu^2/_3$ 10^{-4}: 8,8	5,4	63

In Seewasser zurückgebracht begannen die Eier innerhalb weniger Stunden zu cytolysieren.

1) Normal heisst in diesem Zusammenhang: dieselbe Grössenordnung.

Die Zahlen erlauben keinen Vergleich der Wirksamkeit der Metalle, weil für jeden Versuch anderes Material benutzt wurde und man aus der Tabelle ersieht, dass verschiedenes Material durch das gleiche Metall verschieden stark beeinflusst wird. Lässt man die Metallkonzentrationen um Zehnerpotenzen wachsen, so werden die Eier so schnell zerstört, dass Atmungsversuche (ohne Zentrifuge) nicht ausführbar sind.

Die Giftwirkung der Goldionen wird durch Kaliumcyanid aufgehoben. Seewasser, das in bezug auf KCN $^1/_{1000}$-, in bezug auf Gold $^1/_{5000}$-normal war, liess die Eier 20 Stunden unverändert, während sie in der Kontrolle ohne Cyanid schon nach 30 Minuten zu Schatten geworden waren. Ähnliche Versuche ergaben dasselbe Resultat, wenn nur mehr Cyanid als Gold in der Lösung war. Da das Gold durch Cyanid entionisiert wird, das Cyanid ferner die Atmung herabdrückt, so liegen 2 Erklärungsmöglichkeiten vor, zwischen denen ich nicht entschieden habe.

Die gewöhnliche Wirkung der Schwermetalle hat mit der Beeinflussung der Atmung durch Cu, Ag und Au offenbar nichts zu tun; denn selbst um Zehnerpotenzen grössere Konzentrationen folgender Ionen beeinflussten die Furchung[1]) nicht Co, Ni, Fe, Sn, Zn, Cd, Pb, Pt^{II}, Pt^{IV}.

Metallspuren haben in der biologischen Literatur eine gewisse Rolle gespielt. Ich erinnere an die „obligodynamischen Erscheinungen“ Nägelis[2]) und an die Giftwirkung des aus Kupferapparaten destillierten Wassers, die von Locke[3]) und Herbst[4]) beobachtet wurde; ferner an dem Befund von Herbst[5]), dass man mit Silberspuren, und den von Delage[6]), dass man mit Kupferspuren Anstoss zur Entwicklung geben kann.

1) Beobachtet wurde stets nur wenige Stunden.

2) Carl v. Nägeli, Neue Denkschriften der allg. schweiz. Ges. f. d. ges. Naturw., Bd. XXXIII.

3) Locke, Journal of Physiol., Bd. XVIII (1895).

4) Herbst, Archiv f. Entwicklungsmechanik, Bd. VII (1898).

5) Herbst, Membranbildung durch Silberspuren. Mitt. der zoolog. Stat. Neapel, Bd. XVI, 1904.

6) Delage, Comptes R., Bd. CXLIX, 890.

VI.

Wir haben uns bisher nur mit der Beeinflussung der Oxydationen im befruchteten Ei beschäftigt; wir gehen jetzt über zu den Versuchen am unbefruchteten Ei, die wegen ihrer Beziehung zur Entwicklungserregung spezielles Interesse beanspruchen, die aber auch allgemein für den Mechanismus der Oxydationen neues ergaben.

Anstoss zur Entwicklung ist bis jetzt durch folgende Agenzien[1]) gelungen.

1. Hypertonische Lösung (Loeb[2]).
2. OH-Ionen (Loeb[3]).
3. Silberspuren (Herbst[4]) und neuerdings auch Kupferspuren (Delage[5])).
4. Lipoidlösliche Säuren (Loeb[6])).
5. Lipoidlösende Stoffe, wie Alkohole, Benzol, Ester (Hertwig[7]), Herbst[8]), Loeb[9])).

Dass derartig vorbehandelte Eier, wenn sie in Seewasser sich zu entwickeln beginnen, mehr Sauerstoff verbrauchen als unbefruchtete Eier, ist nach den bisher mitgeteilten Versuchen nur ein anderer Ausdruck für die Tatsache der Entwicklungserregung. Wenn wir aber vorausschicken, dass alle fünf erregenden Flüssigkeiten Kern- und Zellteilung des befruchteten Eies vollständig sistieren, so ist es durchaus merkwürdig, dass die Atmung während der Exposition in einem Teil dieser Flüssigkeiten steigt.

Für die Atmung des unbefruchteten Eies in der hypertonischen Lösung sind in den beiden früheren Mitteilungen

---

1) Hierbei sind Versuche mit Serum und ähnlichen unbekannten Gemischen nicht berücksichtigt.

2) Loeb, Entwicklungserregung, S. 37.

3) „ „ S. 118.

4) Herbst, loc. cit.

5) Delage, loc. cit.

6) Loeb, Entwicklungserregung, S. 60.

7) O. u. R. Hertwig, Über den Befruchtungs- und Teilungsvorgang des tierischen Eies, Jena 1887.

8) Biolog. Zentralblatt, Bd. XIII (1893).

9) Loeb, Entwicklungserregung, S. 63 u. 64.

Versuche mitgeteilt. Die Verhältnisse liegen genau so bei Strongylocentrotus, wie bei Arbacia, d. h. in der hypertonischen Lösung (1000 Seewasser, 43 g NaCl, 30 ccm $^{n}/_{10}$-NaOH) verbraucht das unbefruchtete 8—10mal so viel Sauerstoff als in Seewasser. In gleicher Weise steigern OH-Ionen und Spuren der Metalle Kupfer, Silber, Gold die Atmung des unbefruchteten Eies um viele 100%.

			Kontrolle in Seewasser:
[12]	Ag = Seewasser, Konzentration	10^{-5}: 8,0	1,0 Th.
[13]	Au = „ „	10^{-5}: 5,4	1,8 „
[14]	Cu = „ „	10^{-5}: 5,4	1,0 „
[15]	OH „	ca. 10^{-3}: 8,5[1])	1,3 „

In allen diesen Lösungen wird die Oberfläche des Eies etwas runzlig und häufig bilden sich Membranen. Besonders schön ist die Membranbildung in Silberseewasser, wie dies Herbst[2]) beschrieben hat. Wollte ich beim Zurückbringen in Seewasser Furchungen erzielen, so eignet sich am besten eine $^{1}/_{500000}$-normale Goldseewasserlösung und eine Exposition von 20 Minuten bei 13°.

Die fünf entwicklungserregenden Mittel lassen sich nun in zwei Klassen trennen, und zwar auf Grund ihres Verhaltens zu befruchteten Eiern: hypertonische Lösungen, Alkalien, Metallspuren können die Oxydationsprozesse beschleunigen; Säuren und fettlösende Stoffe können sie verlangsamen. Beispiele für das Verhalten der befruchteten Eier gegen OH-Ionen und Metallspuren sind mitgeteilt. In der hypertonischen Lösung 1000 ccm Seewasser, 43 g NaCl, 30 ccm $^{n}/_{10}$-NaOH) fand ich (Strongylocentrotus befruchtet):

Seewasser	Hypertonische Lösung
2,1	5,7 H.

(Die Atmung des befruchteten Eies von Strongylocentrotus in der hypertonischen Lösung wird also nicht so stark beeinflusst wie bei Arbacia; dies ist der einzige erhebliche Unterschied, den ich bis jetzt zwischen den beiden Seeigeln fand).

---

1) Die Zahlen für OH sind umgerechnet. Siehe Versuche.

2) loc. cit.

Beispiele für lipoidlösende Stoffe:

[17] Urethan: 3,8, Kontrolle in Seewasser: 5,7 Th.
[18] Alkohol: 1,9, „ „ „ 3,1 „

Dahin gehören auch die in Abschnitt I erwähnten Versuche mit Phenylurethan in stärkerer Konzentration. Beispiele für Säuren sind in Abschnitt II z. B. Kohlensäure gegeben; wobei wieder zu beachten ist, dass man es bei der Wirkung einer eindringenden Säure mit drei Faktoren zu tun hat: Säuremoleküle im Ei, Wasserstoffionen im Ei, Wasserstoffionen ausserhalb des Eies.

Wir haben so das wichtige Resultat: die Oxydationen im unbefruchteten Ei können durch Stoffe entfesselt werden, die die entfesselten Oxydationen herabdrücken. Es handelt sich offenbar bei den Säuren und fettlösenden Stoffen um eine indirekte Wirkung auf die Oxydationen. In der Tat hat Loeb gefunden, dass für die Entwicklungserregung durch die Substanzen der zweiten Klasse kein Sauerstoff nötig ist. Hier führen die Loebsche Membranbildungstheorie und meine Resultate über die Bedeutung der Oberfläche für die Atmung wieder zusammen: die zweite Gruppe beschleunigt die Atmung, weil sie die Oberfläche verändert.

Von der ersten Gruppe ist die Wirkung der OH-Ionen am besten untersucht. Wir rufen uns erstens das Resultat des Abschnitts II ins Gedächtnis zurück: die OH-Ionen, die nicht eindringen, reagieren nicht direkt mit der Oberfläche; bedenken zweitens, dass sie nur bei Gegenwart von Sauerstoff die Oberfläche verändern (sie wird runzlig und führt häufig zur Membranbildung) und drittens, dass zu dieser Veränderung der Oberfläche, wenn sie mit andern Mitteln vorgenommen wird, nach der Loebschen Entdeckung kein Sauerstoff nötig ist; das zusammen heisst nichts anderes, als dass die OH-Ionen mit Hilfe der Sauerstoffatmung die Oberfläche des unbefruchteten Eies verändern.

Die erste Gruppe wirkt also primär auf die Oxydationen; die Folge davon ist eine Veränderung der Oberfläche, die Folge der veränderten Oberfläche ist eine Veränderung der Atmung. Die zweite Gruppe

verändert primär die Oberfläche und nur dadurch die Oxydationen.

Es wird auf den ersten Blick merkwürdig erscheinen, dass die Sauerstoffatmung imstande ist, die Oberfläche des Eies zu verändern. Wir kennen aber ein sehr schönes und übersichtliches Experiment von Loeb[1]), die künstliche Membranbildung durch Säuren, die die grösste Ähnlichkeit mit der Sauerstoffatmung hat. Die Analogie wird noch deutlicher bei der Godlewskischen Modifikation[2]) der Methode, der die Fettsäure durch Kohlensäure ersetzte.

Die künstliche Membranbildung nach Loeb geht in Neapel quantitativ, und derartig erregte Eier sind von natürlich befruchteten kaum zu unterscheiden. Es kommt aber, ebenso wie in Kalifornien, in der Regel nicht zu Furchungen. Loeb[3]) vermutete, dass die Oxydationsprozesse zwar in Gang gesetzt sind, aber in falschen Bahnen verlaufen. Die Messung ergab, dass die erste dieser Vorstellungen durchaus zutrifft. Die Oxydationen der Eier mit künstlichen Membranen sind fast von derselben Grösse, wie die befruchteter Eier in Seewasser.

	Befruchtete Eier	Künstliche Membraneier
[18]	10,5	9,0 Th.

VII.

Das Verhalten der Eier mit künstlichen Membranen gibt Veranlassung zu einer Bemerkung über das Verhältnis der Oxydationsprozesse zur Entwicklung. Wir haben in Abschnitt I gesehen, dass man die Entwicklung des befruchteten Eies verhindern kann, ohne dass die Oxydationen erheblich beeinflusst werden, und konnten im Zusammenhang mit andern Tatsachen daraus den sichern Schluss ziehen, dass der Stoffwechsel nicht die Folge, sondern eine Bedingung der Entwicklung ist; aber auch nur eine Bedingung. Wir kennen jetzt eine Reihe von Fällen, in denen die Oxydationen auf der richtigen Höhe sind, die Entwicklung aber ausbleibt: Narkose, Ammoniak, Eier mit künstlichen Membranen. Wir

1) Loeb, Entwicklungserregung, S. 60.
2) Archiv für Entwicklungsmechanik, Bd. XXVI, S. 278.
3) Loeb, Entwicklungserregung, S. 71.

kennen ferner die Beeinflussung der Atmung durch die Wasserstoffionen, Hydroxylionen und Metallspuren, die keine entsprechende Beeinflussung der Entwicklungsgeschwindigkeit, sondern Stillstand der Entwicklung zur Folge hat. An der Grenze aller derartigen Beeinflussungen findet man verlangsamte Entwicklungsgeschwindigkeit bei unveränderter oder gesteigerter Atmung. Es wird dann also zu derselben physiologischen Leistung viel mehr Sauerstoff verbraucht, als normalerweise.

Eine ganz besondere Stellung nimmt die Blausäure als oxydationsbeeinflussendes Mittel ein. Hier liegen die Verhältnisse so, dass einer stark verminderten Oxydationsgeschwindigkeit auch eine stark verminderte Entwicklungsgeschwindigkeit entspricht; und zwar ist diese verlangsamte Entwicklung, die ich ca. 16 Stunden lang beobachtete, sehr schön und von der normalen Entwicklung nur durch die Geschwindigkeit zu unterscheiden. Wenn man also in befruchteten Eiern die Oxydationen, immer reversibel, einerseits durch Wasserstoffionen, anderseits durch Blausäure, um den gleichen Betrag herunterdrückt, so findet man im ersten Falle keine Entwicklung, im zweiten normale, verlangsamte Entwicklung. Nachdem ich gezeigt habe, dass die Wasserstoffionen nur auf die Oberfläche wirken, ist der erste Fall nicht wunderbar; denn sie werden eben ganz einseitig die Verbrennungen beeinflussen, und diese sind sicher nicht die einzigen chemischen Prozesse, die im Ei vor sich gehen. Um so wichtiger ist die Wirkungsweise der Blausäure, von der man weiss, dass sie in die Zellen eindringt; es gibt keinen besseren Vergleich, als die Temperaturwirkung, bei der auch Oxydations- und Entwicklungsgeschwindigkeit parallel gehen. Vielleicht werden die hier angedeuteten Verhältnisse einmal eine Rolle spielen, wenn man in die Ursache der Zersetzlichkeit lebender Moleküle tiefer eindringen will. — Praktisch, bei Anstellung von Experimenten, sind sie geeignet, vor einem Irrtum zu bewahren. Ich habe oben mitgeteilt, dass die reine Kochsalzlösung deshalb giftig wirkt, weil sie die Oxydationen so enorm steigert. Man könnte nun versuchen, die Oxydationen wieder durch Blausäure auf den

normalen Wert herabzudrücken und dann normale Entwicklung zu erwarten. Ich selbst habe, ehe ich mir über die Cyanidwirkung klar war, solche Versuche gemacht und natürlich stets mit negativem Erfolg. Für derartige Ziele müsste man Agenzien kombinieren, von denen das eine einseitig die Oxydationen steigert, das andere einseitig die Oxydationen herabdrückt; also nach den bisherigen Erfahrungen auch keine eindringenden Substanzen, die ja die Entwicklung schon verhindern, ehe sie die Oxydationen beeinflussen.

Beispiele für Cyanid (Strongylocentrotus befruchtet):

	In Seewasser	Cyanid $^1/_{100000}$-n.	Cyanid $^1/_{10000}$-n.
[19]	6,2	2,0	1,2 Th.

In der $^1/_{100000}$-n-Lösung sehr langsame Furchung; in der $^1/_{10000}$-n-Lösung keine Furchung.

VIII.

Wenn auch der Mechanismus der Atmung bisher unbekannt war, so wusste man doch in der Regel bei Organismen, die Wärme produzieren, sich bewegen, wachsen, zu welchen Leistungen die disponibel werdende Energie herangezogen wurde. Bei der Furchung nimmt die Gesamtmasse der Zelle nicht zu, sondern sogar etwas ab; das einzige, was man sieht, ist eine rapide Vermehrung der Kerne, und so entstand die Hypothese, dass der Sauerstoff zur Bildung der Kerne verwandt würde. Die Konsequenz aus dieser Auffassung, ein rapides Anwachsen des Sauerstoffverbrauchs, traf nicht zu. Weil die Frage von allgemeiner Bedeutung ist, habe ich meine früheren Versuche wiederholt nachgeprüft und immer bestätigt gefunden: der Sauerstoffverbrauch wächst ganz langsam im Lauf der Furchung und nicht entfernt in dem Massstabe, wie die Kerne.

Beispiel Strongylocentrotus befruchtet in Seewasser:

	Im 2-Zellenstadium	Im 64-Zellenstadium
[20]	7,3	10,2 Th.

Wir stehen hier also bezüglich des Zweckes der Oxydationen vor einem vollständigen Rätsel. Die physikalisch-

chemische Ursache des Anwachsens der Oxydationen im Lauf der Furchung wird, nach den obigen Resultaten, zweifellos mit dem Wachsen der Oberfläche zusammenhängen. Auf quantitative Beziehungen einzugehen, ist verfrüht.

IX.

Man hat häufig im Zusammenhang mit den heutigen Anschauungen über die Bedeutung der intracellulären Fermente daran gedacht, dass das Spermatozoon derartige Stoffe in das Ei einführte oder dort aktivierte. Die Vermutungen beziehen sich teils auf Oxydasen, teils auf Lipasen.

Die Brüder Hertwig[1]) haben zuerst angegeben, dass es gelingt, mehrere Spermatozoen in ein Ei zu bringen. Derartige Eier zerfallen dann etwa zu gleicher Zeit wie die normal befruchteten in zwei Zellen, in mehrere Furchungskugeln[2]). Ich habe die Atmung solcher polyspermer Eier mit der normaler Eier verglichen und gefunden, dass der Sauerstoffverbrauch polyspermer Eier nur ganz unwesentlich erhöht ist. Man kann dieses Resultat auch so ausdrücken, dass ein polyspermes Ei z. B. nur die Hälfte Sauerstoff verbraucht, um in das Vierzellenstadium zu gelangen, als ein monospermes.

Beispiel:

	Monosperm	Polysperm
[21]	7,6	8,3 Th.

Dieses Resultat gibt gewiss keinen Anhaltspunkt dafür, dass das Spermatozoon Oxydasen ins Ei bringt. Dagegen stimmt es wieder gut zu der Anschauung, dass die Veränderung der Plasmahaut das Wesentliche für die Oxydationen ist; wenn die Haut verändert ist, so werden weitere Spermatozoen die Oxydationen nicht mehr beeinflussen.

Die Vermutung, dass bei der Entwicklungserregung Lipasen im Spiel sind, hat Loeb[3]) häufig ausgesprochen und

1) Über den Befruchtungs- und Teilungsvorgang des tierischen Eis unter dem Einfluss äusserer Agentien. Jena 1887.

2) Vgl. auch Boveri, Zellenstudien, Heft 5.

3) Loeb, Entwicklungserregung, S. 196.

auf die Keimung ölhaltiger Samen hingewiesen, bei der solche Fermentationen beobachtet wurden. Lyon hat dann auf dem internationalen Physiologen-Kongress in Heidelberg behauptet, einen Unterschied im Lipasegehalt befruchteter und unbefruchteter Seeigeleier gefunden zu haben. Eine Arbeit darüber liegt nicht vor.

Ich setzte buttersaures Äthyl zu Seewasser, in dem sich die Eier befanden, und drehte die Eier mit der esterhaltigen Flüssigkeit, wie es für die Atmungsversuche beschrieben ist. Der Ester dringt in das lebende Ei ein und die durch Verseifung gebildete Buttersäure tritt quantitativ aus, weil der Partialdruck der Buttersäuremoleküle in dem bicarbonathaltigen Seewasser fast gleich Null ist. Die Buttersäure lässt sich im Seewasser neben Ester und Kohlensäure sehr genau bestimmen (siehe Methodik). Es stellte sich zunächst heraus, dass das unbefruchtete lebende Ei Buttersäureester spaltet, und zwar in einer Menge, die im Verhältnis zum Gesamtstoffwechsel gar nicht unbedeutend ist. Als ich aber Eier untersuchte, deren Stoffwechsel durch Befruchtung oder hypertonische Lösung gesteigert war, konnte nicht der geringste Unterschied konstatiert werden (Versuche Anhang 22). Lyon arbeitete nicht mit lebenden, sondern zerquetschten Eiern; vielleicht erklären sich so meine abweichenden Resultate. Es ist aber, abgesehen von den Bedenken, die stets gegen Versuche mit zerstörten Zellen zu erheben sind, bei der Lyonschen Versuchsanordnung schwer, wirklich vergleichbare Messungen anzustellen (Art des Zerkleinerns usw.). Zu betonen ist noch, dass die von mir gewählte Konzentration des Buttersäureesters weder für das unbefruchtete Ei entwicklungserregend, noch für das befruchtete entwicklungshemmend war.

Zusammenfassend kann ich sagen, dass ich für die Bedeutung intracellulärer Fermente bei der Entwicklungserregung keine experimentelle Grundlage finden konnte.

X.

Um zu wissen, was aus dem Sauerstoff im Ei wird, habe ich zunächst einige Kohlensäurebestimmungen gemacht, die

ergaben, dass die gebildete Kohlensäuremenge von derselben Grössenordnung ist, wie die verbrauchte Sauerstoffmenge. Dies wurde nachgewiesen für die befruchteten Eier in Seewasser und für die unbefruchteten in der hypertonischen Lösung.

Die Menge der Atmungskohlensäure ist klein im Verhältnis zur Kohlensäuremenge im Seewasser. Ich habe deshalb mit künstlichen Salzlösungen gearbeitet. Die an das Wasser abgegebene Kohlensäure kann nicht als Atmungskohlensäure betrachtet werden. Ich habe deshalb die in den Eiern präformierte Kohlensäure vor und nach dem Versuch bestimmt, gleichzeitig den Kohlensäuregehalt der Salzlösung.

Die Gesamtdifferenz entspricht dann der neuentstandenen Kohlensäure.

Schlussbemerkung.

Das wichtigste und durchaus unerwartete Resultat der vorliegenden Untersuchung ist der Nachweis, dass die Plasmahaut als solche, nicht deshalb, weil Stoffe durch sie ein- oder austreten, eine wichtige Rolle im oxydativen Stoffwechsel der Zelle spielt. In Kapitel II konnte dies geradezu bewiesen werden.

Alle Substanzen, die die Oxydationen direkt steigern, d. h. alle, die die Atmung des befruchteten Eies steigern, sind solche, die nach Overton in die lebende Zelle nicht eindringen.

Die Biologen, die mit Presssäften von Organen arbeiteten, haben in der Regel die Beobachtung gemacht, dass gerade die wichtigsten chemischen Funktionen darin fehlen. Man hat diese Erfahrung so ausgedrückt, dass für die meisten biologischen Reaktionen Struktur Vorbedingung wäre. Nachdem die Bedeutung der Oberfläche für die Oxydationsprozesse erkannt ist, haben derartige Befunde nichts Überraschendes mehr.

Man wird fragen, was man sich unter der sonderbaren Rolle der Plasmahaut zu denken hat. Es ist ebenso leicht, Hypothesen hierüber zu machen, wie es schwer ist, zwischen derartigen Vermutungen zu entscheiden, und deshalb hat eine Diskussion der Möglichkeiten wohl wenig Zweck. Ich selbst

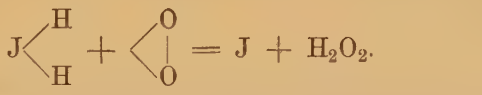
neige, auf Grund der Tatsachen in Abschnitt II und III, zu einer elektrochemischen Auffassung der Oxydationsprozesse, wobei die elektromotorischen Kräfte durch auswählende Löslichkeit der Plasmahaut für Wasserstoffionen entstünden.

Man könnte aber auch daran denken, dass die Stoffe ausserhalb der Zelle an der Grenze von Plasmahaut und umspülendem Medium verbrannt würden, wobei dann wieder Adsorptionen eine grosse Rolle spielen könnten usw. usw.

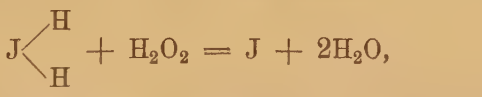
Methodik.

Die Sauerstoffbestimmung mit Indigo und Hydrosulfit im Seewasser. Die Methode von Schützenberger und Risler beruht darauf, dass Indigblau durch Hydrosulfit zu Indigweiss reduziert, das Indigweiss mit dem sauerstoffhaltigen Wasser in Reaktion gebracht und das gebildete Indigblau durch Hydrosulfit zurücktitriert wird. Die Methode ist bisher für Seewasser nicht benutzt worden und hat auch sonst offenbar häufig keine gute Resultate gegeben.

Die Reaktion des Sauerstoffs mit Indigweiss geht, wie wir durch Manchot und Herzog[1]) jetzt wissen, nach folgendem Schema:



Das Wasserstoffsuperoxyd reagiert dann bei Gegenwart von Alkali mit einem 2. Molekül indigweiss.



sodass also für jedes Atom Sauerstoff schliesslich ein Molekül Indigblau entsteht.

Sowie das Superoxyd nicht sehr schnell mit Indigweiss reagiert, beobachtet man, dass nach eingetretener Entfärbung allmählich wieder Blaufärbung auftritt. Soviel ich aus der Arbeit von Roscoe[2]) ersehen kann, hat er immer mit dieser Nachbläuung zu tun gehabt und dadurch erklären sich wohl

1) Liebigs Ann., Bd. CCCXVI, S. 318 (1901).
2) Berichte d. d. chem. Gesellschaft, Bd. XXII.

auch die Schwierigkeiten, die er z. B. bei Gegenwart von NH_3 fand.

Da wir durch Manchot wissen, dass die sekundäre Reaktion nur bei Gegenwart von Alkali schnell verläuft, so ist eine alkalische Reaktion der Flüssigkeit nötig. Nun bemerkt man aber bei Sauerstoffbestimmungen im Seewasser, dass bei alkalischer Reaktion die Nachbläuung auftritt. Dies kommt daher, dass in alkalischer Lösung das Calciumsuperoxyd schneller ausfällt, als es mit dem Indigweiss reagiert und dann erst allmählich wieder in Lösung geht, in dem Massstab, als das gelöste Peroxyd durch Reaktion mit dem Indigweiss fortgeschafft wird.

Die praktische Konsequenz dieser Verhältnisse ist, dass eine ganz bestimmte Reaktion eingehalten werden muss, und zwar fand ich, dass eine bicarbonathaltige Flüssigkeit, die etwas Soda enthält, diese Bedingung am besten erfüllt; denn ein solches System ist gleichzeitig ziemlich resistent gegen Reaktionsverschiebung und das ist wesentlich für eine bequeme Anwendung der Methode.

Die Menge Wasser, die zur Bestimmung verwendet wurde, betrug ca. 219 ccm; auf Grund obiger Überlegung wurde zu einem neutralen Bestimmungs-Wasser 0,5 n-Na_2CO_3 und 0,5 ccm n-$NaHCO_3$-Lösung zugefügt; zu Seewasser nur 0,5 n-Na_2CO_3; zu alkalischen Flüssigkeiten n-$NaHCO_3$ usw.

Das Hydrosulfit stammte von der Bad. Anilin- und Sodafabrik. Ca. 3 g wurden in 1500 ccm Wasser gelöst und 30 ccm n-NaOH zugesetzt; es wurden ferner 5 g reines indigodisulfosaures Na (gleichfalls von der Bad. Anilin- und Sodafabrik) zum Liter gelöst. Die Titerstellung geschah, wie in der zweiten Arbeit angeführt, mit Kupfer.

In dieser Form ist die Methode ausgezeichnet. Im besonderen habe ich mich überzeugt, dass Ammoniak, selbst in grossen Mengen, die Resultate nicht im geringsten beeinflusst. Für spezielle Fälle, z. B. bei Gegenwart von viel Phosphat, fällte ich in dem Wasser, das Ca, K und Na enthielt, das Calcium durch eine konzentrierte Lösung von Oxalat aus. Der Umschlag in der milchigen oxalathaltigen Flüssigkeit ist noch besser zu sehen als in einer klaren

Flüssigkeit und vielleicht werden manche ein derartiges Verfahren, bei dem ein Überschuss an Alkali nichts schadet, vorziehen.

Zu der Winklerschen Methode ist nichts hinzuzufügen. — Die Kohlensäurebestimmung habe ich in einer besonderen Mitteilung beschrieben[1]).

Bestimmung kleiner Buttersäuremengen im Seewasser: 5 ccm einer mit ausgekochtem destillierten Wasser hergestellten Buttersäurelösung verbrauchten beim direkten Titrieren, mit 190 ccm ausgekochtem Wasser verdünnt, 1. 8,6 ccm $^n/_{80}$ n-BaOH, 2. 8,7 (Phenolphthalein). 5 ccm derselben Lösung wurden zu 150 ccm Seewasser zugesetzt; dann 5 ccm 10%ige $KHSO_4$-Lösung und ca. 20 Minuten zur Entfernung der Hauptmenge der CO_2 am Rückflusskühler gekocht. Dann am absteigenden Kühler destilliert; zuerst wurden 90 ccm abdestilliert; dann 2mal 50 ccm CO_2-freies Wasser nachgefüllt und 50 ccm abdestilliert: verbraucht 8,6 ccm $^n/_{80}$-BaOH. Soll die Buttersäure neben Buttersäureester bestimmt werden, so wird zunächst aus alkalischer Lösung mit säurefreiem Äther der Ester ausgeschüttelt.

Versuche.

Das Volumen der Flaschen, in denen die Eier zur Sauerstoffbestimmung gedreht wurden, war ca. 306 ccm; das Volumen der Flaschen, in die das Bestimmungswasser abgehebert wurde, ca. 225 ccm für die Titration mit Thiosulfat. Der Bestimmungstrichter für die Titration mit Hydrosulfit fasste 219 ccm. Die Zahlen also, die pro 225 resp. 219 ccm angegeben sind, sind die abgelesenen Zahlen in Kubikzentimeter. Der Fehler bei der Winklerschen Bestimmung ist etwa 0,2 ccm, bei der Indigomethode etwa 0,4 ccm, wenn man als Fehler die grössten Abweichungen zwischen zwei Bestimmungen bezeichnet, die vorkommen können. Der prozentische Fehler der Bestimmung ist demnach, wie ein Vergleich mit den Ausschlägen lehrt, sehr klein. Grössere Fehler entstehen durch ganz andere Faktoren; vergleicht man z. B. die Atmung von Eiern, die sich furchen, mit

1) O. Warburg, Zeitschrift f. physiolog. Chemie, Bd. 61, 261.

solchen, die sich nicht furchen, so muss man stets berücksichtigen, dass im Lauf der Furchung die Atmung steigt; diese Steigerung lässt sich aber noch nicht quantitativ in Rechnung bringen. Andere Fehler können entstehen durch verschiedene Senkungsgeschwindigkeiten der Eier. Alle diese Faktoren werden bei spätern Arbeiten eventuell zu berücksichtigen sein; hier aber hat es sich nur darum gehandelt, die Verhältnisse ganz im groben festzulegen, und es ist nie aus einer kleinen Differenz irgend ein Schluss gezogen worden.

1. Strongylocentrotus befruchtet 1^{30}. t = 16^{0}. 2^{30} Material in 2 gleiche Teile. Ein Teil in Seewasser, der andere in Phenylurethan-Seewasser (1 g Phenylurethan, in 5 ccm absolutem Alkohol gelöst, in 12 Liter Seewasser. Lösung dann etwa $^{1}/_{2000}$-normal). Gewaschen mit den beiden Flüssigkeiten. Atmungsversuch 2^{55}—3^{40}. Nach der Atmung waren die Eier aus Seewasser im 4-Zellenstadium, die aus Phenylurethan-Seewasser ungefurcht. Die in Seewasser hatten 7,5, die in Phenylurethan-Seewasser 7,3 ccm Thiosulfat pro 225 ccm verbraucht. Proben nach der Atmung in Seewasser zurückgebracht, ergaben schwimmende Larven (diese Angaben heissen stets, dass sich alle Eier zu schwimmenden Larven entwickelten).

Die Grenzkonzentration des Phenylurethans, die eben die Furchung verhindert, ist für die verschiedenen Seeigel nicht ganz gleich, und wird überhaupt stets zweckmässig durch einen Vorversuch ausprobiert.

2. Strongylocentrotus befruchtet 3^{00}. t = 15^{0}. Verteilt zu gleichen Teilen 3^{30} in Seewasser und Phenylurethan-Seewasser von bekanntem Sauerstoffgehalt. Phenylurethan-Seewasser: 0,5 g in 2,5 ccm Alkohol in 1500 ccm Seewasser. Lösung dann ca. $^{1}/_{500}$-n. Mit den Atmungsflüssigkeiten gewaschen. Atmungsversuch 3^{45}—4^{30}. Nach der Atmung waren die Eier aus Seewasser im 2-Zellenstadium, die aus Phenylurethan ungefurcht. Verbrauch auf 225 ccm in Seewasser 6,5, in Phenylurethan-Seewasser 3,7 ccm Thiosulfat.

3. Strongylocentrotus befruchtet 11^{10}. 11^{30} in 2 gleiche Teile. Beide gewaschen mit einer künstlichen „Salzlösung“

(100 NaCl, 2,2 KCl, 2,0 $CaCl_2$, alle ca. $^6/_{10}$-normal), solange, bis mit $BaCl_2$ das abgeheberte Waschwasser nur noch bei längerem Stehen opalescent wird. Dann einmal mit Lösung I resp. Lösung II gewaschen.

Lösung I: 1000 ccm Salzlösung + 10 ccm $^n/_{10}$-NaOH.

Lösung II: 1000 ccm Salzlösung + 5 ccm $^m/_2$-Na-Bicarbonat + 2 ccm $^n/_{10}$-NaOH.

Atmungsversuch 12^{10}—1^{00}. Nach der Atmung Eier aus I ungefurcht, aus II alle im 4-Zellstadium. Verbrauch auf 225 ccm in I 12,8, in II 6,8 ccm Thiosulfat.

Die OH-Ionenkonzentration, bei der die Furchung vollständig sistiert ist, wechselt etwas und ist deshalb durch einen Vorversuch auszuprobieren.

4. Strongylocentrotus befruchtet 9^{15}. Verteilt im 2-Zellenstadium zu gleichen Teilen. Lösung I: 100 NaCl, 2,2 KCl, 2,0 $CaCl_2$, alle $^6/_{10}$-normal. Mit Lösung I resp. mit Seewasser gewaschen. Das destillierte Wasser, das zur Herstellung von Lösung I benutzt war, war nicht ausgekocht. Atmungsversuch 12^{45}—2^{15}. Verbrauch auf 219 ccm in Lösung I 0,8 ccm, in Seewasser 2,4 ccm Hydrosulfit. (Seewasser darf als Kontrollflüssigkeit genommen werden; denn eine dem Seewasser isoalkalische „Salzlösung" verändert die Atmung nicht, wie aus Versuch 10 hervorgeht).

5. Strongylocentrotus befruchtet 9^{40}. t = 15^0. Salzlösung (100 NaCl, 2,2 KCl, 2,0 $CaCl_2$ alle $^6/_{10}$-normal) mit ausgekochtem Wasser hergestellt. Dann pro Liter 0,5-n-NaH_2PO_4. Eier mit dieser Salzlösung gewaschen, bis Reaktion des Waschwassers sich nicht mehr ändert. Atmungsversuch 11^{15}—12^{15}. Kein Ei war gefurcht. Verbrauch auf 219 ccm 1,1 ccm Hydrosulfit. Nun mit Seewasser gewaschen und Atmung in Seewasser 12^{30}—1^{30}. Verbrauch auf 219 ccm 5,7 ccm Hydrosulfit.

6. Strongylocentrotus befruchtet 10^{10}. Verteilt zu gleichen Teilen 10^{40} in Lösung I und II und damit gewaschen, bis Reaktion unverändert.

Lösung I: 1000 ccm Seewasser, 10 ccm $^n/_{10}$-HCl.

Lösung II: 1000 ccm Salzlösung, an der Luft geschüttelt.

Die Tension der Kohlensäure in Lösung I bestimmte ich mit Hilfe von Herrn Dr. Henze nach Krogh. Bei der Herstellung der Lösung I sättigt man das Seewasser zuerst mit Sauerstoff, unterschichtet dann die Salzsäure, schüttelt in ganz gefüllter Flasche um und hebert dann vorsichtig ab. Sauerstoffverbrauch in I 5,5 Thiosulfat, in II 5,8 ccm auf 225 ccm.

7. Die Salzlösungen wurden mit nicht ausgekochtem destillierten Wasser hergestellt.

Lösung I: Salzlösung (100 NaCl, 2,2 KCl, 2,0 $CaCl_2$).

Lösung II: 1000 ccm Salzlösung + 5 ccm $^n/_2$-Natriumbicarbonat + 2 ccm $^n/_{10}$-CaOH.

Lösung III: 1000 ccm Salzlösung + 12 ccm $^n/_{10}$-NaOH + 0,3 g NaCl.

Strongylocentrotus befruchtet 11^{05}. In 2 gleiche Teile geteilt und zunächst sehr gründlich durch Waschen mit neutraler Salzlösung vom Seewasser befreit. Dann in Lösung II und III verteilt 12^{10}. Zu Beginn des Atmungsversuchs Hantelstadium. Versuch 12^{30}—1^{05}. Sauerstoffverbrauch in II 3,9, in III 8,1 ccm Hydrosulfit. Die Eier aus Lösung II, die sich normal gefurcht hatten, wurden nun gründlich mit Lösung I gewaschen, bis die Reaktion des Waschwassers sich nicht änderte. Atmungsversuch in I 2^{55}—3^{30}. Sauerstoffverbrauch 1,4 ccm Hydrosulfit.

8. Strongylocentrotus befruchtet 9^{50}. Lösung I: 1000 ccm Seewasser + 40 ccm $^n/_{10}$-NH_3; ist gegen Phenolphthalein rot, aber bedeutend heller als die alkalische Salzlösung. Eier in 2 gleiche Teile geteilt. Atmungsversuch 11^{00}—12^{00}. Verbrauch in Seewasser 10,1 Thiosulfat, in Lösung I 11,0 ccm pro 225 ccm.

9. Strongylocentrotus befruchtet 12^{00}. 12^{35} in Seewasser, dem pro Liter 1 ccm $^1/_{10}$-n-NaCN-Lösung (frisch bereitet) zugesetzt war. Einmal damit gewaschen. Dann in 2 gleiche Teile. Verteilt 1^{00} in Lösung I und II.

Lösung I: 1000 ccm (nicht ausgekochtes) destilliertes Wasser, 35 g NaCl, 1 ccm $^n/_{10}$-NaCN.

Lösung II: 1000 ccm destilliertes Wasser, 35 g NaCl

+ 22 ccm $^6/_{10}$-n-KCl + 20 ccm $^6/_{10}$-n-$CaCl_2$ + 1 ccm $^n/_{10}$-NaCN.

Beide Lösungen reagieren gegen Neutralrot gelb, gegen Phenolphthalein Spur rosa; kommt von Dissoziation des Cyanids. Gut gewaschen mit den Lösungen. Versuch 1^{40}—2^{30}. Verbrauch in I pro 219 ccm 3,9 ccm Hydrosulfit, in II 0,8 ccm Hydrosulfit. Nach der Atmung waren beide ungefurcht.

9a. Für Cyanidversuche mit der reinen Kochsalzlösung ist es nötig, die Eier vorher mit cyanidhaltigem Seewasser zu waschen; denn die Wirkung der NaCl-Lösung setzt oft sofort ein und offenbar schneller, als die Blausäure in die Zellen eindringt.

Durch Vorversuche muss man sich ein Material verschaffen, das möglichst empfindlich gegen NaCl ist; ferner die Versuche immer erst zirka eine Stunde nach der Befruchtung beginnen.

Loeb hat öfters auf periodische Erscheinungen bei Giftwirkungen hingewiesen. Ich glaube, dass das NaCl in Abständen von 5 zu 5 Minuten nicht gleich wirkt (bei etwa 16^0), verfüge aber nicht über die nötige Zahl von Versuchen, um das sicher behaupten zu können.

10. Strongylocentrotus befruchtet 11^0.

Lösung I: 100 NaCl + 2,2 KCl + 2,0 $CaCl_2$ + 7,8 $MgCl_2$ + 3,8 $MgSO_4$, alle $^6/_{10}$-normal; dazu 5 ccm $^m/_2$-Na-Bicarbonat + 2 $^n/_{10}$-NaOH pro Liter.

Lösung II: 100 NaCl + 2,2 KCl + 2,0 $CaCl_2$, alle $^6/_{10}$-normal; dazu 5 $^m/_2$-Na-Bicarbonat + 2 $^n/_{10}$-NaOH pro Liter.

Lösung III: 100 NaCl + 2,0 $CaCl_2$, $^6/_{10}$-normal; dazu 5 $^m/_2$-Na-Bicarbonat + 2 $^n/_{10}$-NaOH pro Liter.

Die Reaktion dieser 3 Lösungen entspricht dem des Seewassers.

Eier in 2 gleiche Teile geteilt; ab 11^{30} mit I und II gewaschen; bis erst beim Stehen Opalescenz mit $BaCl_2$ in II. Atmungsversuch 11^{55}—12^{55}. Sauerstoffverbrauch pro 225 ccm in I 7,8, in II 7,5 ccm Thiosulfat. Nach der Atmung Eier sowohl aus I wie aus II im 2-Zellenstadium. Nun die Eier, die in I geatmet hatten, mit III gewaschen.

Atmungsversuch in III 2^{00}—3^{00}. Sauerstoffverbrauch 8,2 ccm Thiosulfat pro 225 ccm.

11. Lösung I: Seewasser.

Lösung II: 1000 Seewasser + 1,6 ccm 2×10^{-2}-n-$CuSO_4$.

Strongylocentrotus befruchtet 9^{25}. t = 14^0. Verteilt gleiche Teile 10^{05} und je einmal gewaschen. Versuch 10^{25} 11^{25}. Sauerstoffverbrauch in I 7,8, in II 12,0 Thiosulfat pro 225 ccm.

12. Lösung I: Seewasser.

Lösung II: 1000 Seewasser + 0,5 ccm einer 0,3%igen Lösung von Ag_2SO_4, also in bezug auf Ag 10^{-5}-normal. Frisch bereitet. Strongylocentrotus unbefruchtet. In 2 gleiche Teile und ab 10^{35} mit I und II gewaschen. Versuch 11^{00}—12^{00}. Sauerstoffverbrauch pro 225 ccm in I 1,0, in II 8,0 ccm Thiosulfat.

13. Wie 12. Goldlösung 1000 Seewasser + 1 ccm $^n/_{100}$-$AuCl_3$.

14. Wie 12. Kupferlösung 1000 Seewasser + 1 ccm $^n/_{100}$.$CuSO_4$ (0,25%ige Lösung).

15. Lösung I: Seewasser.

Lösung II: 1000 Salzlösung + 10 $^n/_{10}$-NaOH.

Strongylocentrotus unbefruchtet in Seewasser 60 Minuten pro 225 ccm Sauerstoffverbrauch, 2,5 Thiosulfat. Nun die Hälfte der Eier, die in I geatmet hatten, mit neutraler Salzlösung sehr gut gewaschen und in II 45 Minuten. Verbrauch pro 225 ccm 6,4 ccm Thiosulfat. Auf gleiche Mengen und 60 Minuten umgerechnet also in I 1,3, in II 8,5 ccm Thiosulfat verbraucht.

Ähnliche Resultate erhielt ich in einer ganzen Anzahl von Versuchen. Ich habe aber auch Eier gesehen, die sich in der alkalischen Salzlösung nur sehr wenig veränderten (Indikator: Kern geht in die Mitte und wird sehr deutlich; Oberfläche des Eies wird runzlig oder bildet Membranen). Man wird sich deshalb zweckmässig in Vorversuchen ein geeignetes Material aussuchen.

16. Lösung I: Seewasser.

Lösung II: 1000 Seewasser + 10 g Urethan.

Strongylocentrotus befruchtet 10^{25}. t = 15°. 5 Minuten nach der Befruchtung verteilt zu gleichen Teilen in I und II. Einmal mit I und II gewaschen. Atmung 10^{45}—11^{45}. Sauerstoffverbrauch pro 225 ccm in I 5,7, in II 3,8 ccm Thiosulfat. Proben, nach der Atmung in II in Seewasser zurückgebracht, entwickelten sich zu schwimmenden Larven.

17. Lösung I: Seewasser.

Lösung II: 1000 Seewasser + 60 ccm absoluter Alkohol.

Die Konzentration des Alkohols liegt weit über der narkotischen Grenzkonzentration.

Sphaerechinus befruchtet 11^{30}. t = 14°. Gleiche Teile zu verschiedenen Zeiten verteilt in I und II und gewaschen mit I und II einmal. Atmung 12^{45}—1^{45} in Seewasser, 2^{40}—3^{40} in II. Sauerstoffverbrauch in I 3,1, in II 1,9 ccm Thiosulfat pro 225 ccm. Proben, nach der Atmung in Seewasser zurückgebracht, entwickelten sich aus II zu schwimmenden, nicht hochsteigenden Larven.

18. Strongylocentrotus unbefruchtet. Eier mit Seewasser gewaschen und in 2 gleiche Teile. Ein Teil mit Samen befruchtet 10^{45}. Der andere Teil nach der Loebschen Fettsäuremethode etwa zu gleicher Zeit, zur künstlichen Membranbildung gebracht. Dazu eignet sich in Neapel eine Mischung von 50 ccm Seewasser und 2,5 ccm $^{n}/_{5}$-Valeriansäure. Exposition 2 Minuten. Versuch 11^{30}—12^{30} in Seewasser. Sauerstoffverbrauch pro 225 ccm der samenbefruchteten Eier 10,5, der künstlichen Membraneier 9,0 ccm Thiosulfat.

19. Lösung I: Seewasser.

Lösung II: 1000 ccm Seewasser + 1 ccm $^{1}/_{10}$-n-NaCN.

Lösung III: 1000 ccm Seewasser + 0,1 ccm $^{1}/_{10}$-n-NaCN.

Das Cyanid muss stets frisch hergestellt sein.

Strongylocentrotus befruchtet 10^{35}. Verteilt in I und II zu gleichen Teilen 11^{15}. Einmal mit I und II gewaschen. Versuch 11^{35}—2^{35}. Sauerstoffverbrauch pro 225 ccm in I 6,2, in II 1,2 ccm Thiosulfat. Jetzt Material, das in I geatmet hatte, in III gewaschen. Versuch 1^{30}—2^{30}. Sauerstoffverbrauch in III pro 225 ccm 2,0 ccm Thiosulfat.

Proben aus II und III nach der Atmung in Seewasser zurückgebracht, entwickelten sich zu hochsteigenden Larven.

20. Strongylocentrotus befruchtet 10^{35}. In 2 gleiche Teile. Ein Teil $11^{45}-12^{45}$ auf Atmung untersucht. Sauerstoffverbrauch pro 225 ccm 7,3 ccm Thiosulfat. Der andere Teil furchte sich bei 16^{0} in grossen Schalen und wurde $4^{27}-5^{27}$ auf Atmung untersucht. (Beide in Seewasser). Sauerstoffverbrauch pro 225 ccm 10,2 ccm Thiosulfat.

21. Strongylocentrotus unbefruchtet gut gewaschen. Dann in 2 gleiche Teile. Ein Teil, 50 ccm Seewasser + Eier, in 450 ccm konzentrierter Salzlösung folgender Zusammensetzung: 100 NaCl; 2,2 KCl; 2,0 $CaCl_2$; 7,8 $MgCl_2$; 3,8 $MgSO_4$. Auf 1000 0,5 ccm n-NaH_2PO_4. Dann wenig Sperma dazu und solange Seewasser, bis infolge Änderung der Reaktion die Spermatozoen sich in lebhafter Bewegung um die Eier ansammeln. Dann noch etwas Sperma und 10 Minnten stehen gelassen. So wurde erreicht, dass fast jedes polysperm war und zwar ohne mehr Sperma zu benötigen, als für die monosperme Befruchtung. Dass tatsächlich mehr Spermatozoen eingedrungen waren, wurde besonders dadurch kontrolliert, dass sich die meisten Eier simultan in 3, 4 und mehr Blastomeren teilten[1]). Die Kontrollprobe wurde mit der gleichen Gesamtspermamenge in Seewasser befruchtet, und diese Eier entwickelten sich ganz normal über das 2-Zellenstadium.

Die monosperme und die polysperme Befruchtung wurden etwa gleichzeitig gegen 10^{40} vorgenommen. Atmungsversuch $11^{20}-12^{30}$, Sauerstoffverbrauch der monospermen Eier 7,6, der polyspermen 8,3 ccm Thiosulfat.

22. „Lipase" im (sich furchenden) lebenden Ei.

Strongylocentrotus befruchtet 9^{30}. Nach etwa einer Stunde (t. = 16^{0}) die Eier zentrifugiert. Zentrifugat 20 ccm, mit 140 ccm folgender Flüssigkeit verdünnt: 100 Seewasser + 1 $^{n}/_{10}$-NaOH + 0,1 ccm neutrales buttersaures Äthyl. Also Konzentration des Äthylbutyrats 0,09 ccm = ca. 0,08 g auf 100 ccm = ca. $^{1}/_{145}$-normal. $10^{50}-1^{15}$ in einer Flasche mit grosser Luftblase bei 19^{0} gedreht. Nach dieser Zeit waren die Eier schön gefurcht und die Lösung ganz klar. Zentri-

1) Vgl. auch Boveri, Zellenstudien, Heft 5.

fugiert und überstehende Flüssigkeit 150 ccm, 3mal mit 75 ccm säurefreiem Äther ausgeschüttelt, nachdem 1,5 ccm $^{n}/_{10}$-NaOH dazu. Dann sauer mit 5 ccm 10% $KHSO_4$ und wie oben destilliert. Destillat verbrauchte 6,4 ccm $^{n}/_{80}$-BaOH (Phenolphthalein).

Kontrolle auf die gleiche Weise nur ohne Eier, ergab: 0,5 ccm $^{n}/_{80}$-BaOH.

22a. Strongylocentrotus gleiche Teile. Ein Teil befruchtet, ein Teil unbefruchtet. Buttersäurebestimmung wie in 22, ergab: unbefruchtet 2,9 ccm $^{n}/_{80}$-BaOH, befruchtet 3,0 ccm $^{n}/_{80}$-BaOH.

Stickstoff eines Teils ergab: 33 $^{n}/_{10}$-HCl. Also auf 20 $^{n}/_{10}$-HCl Stickstoff 1,8 $^{n}/_{80}$-BaOH.

22b. Strongylocentrotus unbefruchtet in hypertonischer Lösung.

Hypertonische Lösung: 100 Seewasser + 4 g NaCl + 1 ccm $^{n}/_{10}$-NaOH + 0,1 ccm Äthylbutyrat. Buttersäurebestimmung ergab: = 3,4 ccm $^{n}/_{80}$-BaOH. N = 41 $^{n}/_{10}$-HCl. Also auf 20 $^{n}/_{10}$-Stickstoff 1,7 $^{n}/_{80}$-BaOH; das ist dasselbe, wie unbefruchtete oder befruchtete Eier in Seewasser (22a).

23. Strongylocentrotus unbefruchtet in hypertonischer Lösung.

Hypertonische Lösung: 1000 ccm Salzlösung (100 NaCl; 2,2 KCl; 2,0 $CaCl_2$) mit ausgekochtem destillierten Wasser hergestellt. Dazu 43 g NaCl. Mit Luft geschüttelt unter Kohlensäureabschluss. Eier zunächst sehr sorgfältig mit neutraler CO_2-freier Salzlösung von Seewasser befreit. Dann in 2 gleiche Teile und beide einmal mit der hypertonischen Lösung gewaschen. Dann beide Mengen mit der hypertonischen Lösung auf 306 aufgefüllt. Dann eine Flasche eine Stunde bei 18° gedreht; aus der anderen nach gleichmässigem Verteilen der Eier und nach Zugabe von verdünnter H_2SO_4 ausgekocht. 230 ccm in den CO_2-Bestimmungsapparat gehebert. Vorgelegt 23 ccm BaOH = 32,6 $^{n}/_{100}$ HCl. Nach Versuch 23 ccm BaOH = 30,9 $^{n}/_{100}$ HCl. Nach einer Stunde aus der andern Flasche in gleicher Weise 230 ccm Eier + Flüssigkeit abgehebert. 23 ccm vorgelegten Barytwassers waren jetzt: 29,1 $^{n}/_{100}$-HCl. Die gebildete CO_2 also = 1,8 $^{n}/_{80}$-BaOH.

Es waren also 1,8 auf 230 oder 2,4 auf 306 gebildet. Da 1 ccm $^{n}/_{100}$ HCl = 0,11 ccm CO_2, so waren 0,26 ccm CO_2 gebildet. Die Stickstoffbestimmung wurde im Rest (306—23 ccm) ausgeführt und ergab: 9,5 ccm $^{n}/_{10}$ HCl. Es sind also auf 20 $^{n}/_{10}$ HCl 0,14 ccm CO_2 entstanden. In der gleichen Lösung findet auf 20 $^{n}/_{10}$ etwa ein Sauerstoffverbrauch 0,2 ccm statt (nicht an demselben Material gemessen).

24. Strongylocentrotus befruchtet in künstlicher Salzlösung. Salzlösung: 100 NaCl; 2,2 KCl; 2,0 $CaCl_2$, mit ausgekochtem destilliertem Wasser hergestellt. Auf 1000 ccm 1 ccm $^{n}/_{10}$ KOH. Gegen Neutralrot dann gelb. Befruchtet 11^{05}. Sehr gut mit der künstlichen Salzlösung gewaschen, der aber keine Lauge zugesetzt war. Im übrigen wie 23. Atmung 1^{00}—4^{00}.

Titer Baryt: 23,0 ccm = 32,6 $^{n}/_{100}$-HCl
230 ccm Eier + Flüssigkeit ausgekocht: 23,0 „ = 28,5 $^{n}/_{100}$-HCl
230 ccm Eier + Flüssigkeit nach Atmung ausgekocht: 23,0 „ = 21,5 $^{n}/_{100}$-HCl

Differenz präformierte CO_2.
Differenz entstandene CO_2

N in (306—230) ccm = 11,2 $^{n}/_{10}$-HCl.

Differenz in $^{n}/_{100}$-HCl auf 230: 7,4; auf 306: 9,8; auf 20 $^{n}/_{10}$-N: 4,7 $^{n}/_{100}$-HCl; auf $^{n}/_{10}$-N pro Stunde: 1,6 $^{n}/_{100}$-HCl = 0,18 ccm CO_2 (0^{0}, 760 mm).

Für den Sauerstoffverbrauch wird unter den gleichen Bedingungen ca. 0,2 bis 0,3 ccm pro Stunde und 20 $^{n}/_{10}$ N gefunden.

Diese Zahlen sagen, wie ich noch betonen möchte, über den respiratorischen Quotienten gar nichts; wer dafür Interesse hat, müsste in derselben Probe Sauerstoff und Kohlensäure bestimmen, also Gasanalysen machen.

Die Resultate dieser Untersuchung verdanke ich nicht zum geringsten Teil den schönen Arbeitsbedingungen der zoologischen Station in Neapel. Ich möchte auch hier Herrn Dr. Reinhard Dohrn und Herrn Dr. Martin Henze danken.

Lebenslauf.

Ich, Otto Heinrich Warburg, bin geboren am 8. Oktober 1883 in Freiburg i. B. Meine Eltern sind Dr. Emil Warburg, Präsident der physikalisch-technischen Reichsanstalt in Charlottenburg und seine Frau Elisabeth, geb. Gaertner. Ich bin evangelischer Konfession; preussischer Staatsangehöriger; auf einem humanistischen Gymnasium vorgebildet. Das Abiturienten-Examen bestand ich September 1901 in Berlin. Oktober 1901 wurde ich in Freiburg in der philosophischen Fakultät immatrikuliert; Ostern 1903 in Berlin. Im Januar 1906 bestand ich die Doktorprüfung in Berlin (Hauptfach Chemie). 1905 wurde ich in Berlin in der medizinischen Fakultät immatrikuliert; darauf 1906 (Sommer) in München und bestand im Sommer 1907 in München die ärztliche Vorprüfung; im Sommer 1907 wurde ich in Heidelberg in der medizinischen Fakultät immatrikuliert und studierte 5 Semester klinische Fächer.